

# Informe final publicable de proyecto

## ASPECTOS MOTIVACIONALES DEL COMPORTAMIENTO SEXUAL DE RATAS HEMBRAS DURANTE LA ADOLESCENCIA Y SUS BASES NEURALES

Código de proyecto ANII: FCE\_1\_2017\_1\_136603

17/09/2021

**AGRATI GIADANS, Daniella Sylvia** (Responsable Técnico - Científico)

**REHERMANN, Lucía** (Investigador)

**ARMAS REYES, Magdalena** (Investigador)

**MARÍN MIRANDE, Gabriella** (Investigador)

**URIARTE BÁLSAMO, Natalia** (Investigador)

**ZULUAGA ROUILLER, María José** (Investigador)

**BEDÓ MIZRAHI, Gabriela** (Investigador)

**FERREIRA CASTRO, Annabel** (Investigador)

**FERREÑO, Marcela** (Investigador)

---

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA. FACULTAD DE CIENCIAS (Institución Proponente)

## Resumen del proyecto

Durante la adolescencia el cerebro transita por grandes cambios que se reflejan en un perfil comportamental único. Las ratas, al igual que otros mamíferos, comienzan a expresar interés sexual durante la adolescencia, sin embargo los circuitos neurales que lo controlan están aún en desarrollo. Este proyecto caracterizó el desarrollo de la motivación sexual (tiempo y energía invertidos en interactuar con una pareja) y la ejecución de este comportamiento de ratas hembras durante la adolescencia, y los cambios en los circuitos neurales subyacentes. Determinamos que la motivación sexual (búsqueda del macho) de las hembras aumenta a lo largo de la adolescencia, si bien su comportamiento sexual durante la cópula no difiere del de las adultas. De forma interesante, las adolescentes exhiben juego y alta exploración social, conductas típicas de este período, durante la cópula. El menor interés sexual de las adolescentes se acompañó de una activación diferente de áreas cerebrales que regulan este comportamiento en relación a las adultas. Observamos a su vez, variaciones en la expresión de receptores del neurotransmisor dopamina en el sistema mesocorticolímbico (sistema general de recompensa del cerebro) entre adolescentes y adultas, y una menor sensibilidad de las adolescentes al efecto de la cocaína (droga que aumenta la dopamina en este sistema) sobre la motivación sexual. En conjunto, estos resultados muestran que el comportamiento sexual se expresa durante la adolescencia, pero la motivación sexual, a diferencia de la social, es baja en este período. Este perfil comportamental probablemente se asocie a la inmadurez del sistema mesocorticolímbico, que difiere entre ambas edades. Este proyecto contribuyó a la comprensión de los cambios que ocurren durante un período único de la vida de los mamíferos en las hembras, y abre perspectivas centradas en entender cómo madura el cerebro y el comportamiento social a lo largo del desarrollo.

**Ciencias Naturales y Exactas / Ciencias Biológicas / Biología Reproductiva (aspectos médicos van en "Ciencias Médicas y de la Salud") / Neuroendocrinología del comportamiento**

**Palabras clave: hembras-adolescencia / comportamiento sexual / sistema dopaminérgico mesocorticolímbico /**

## Introducción

La adolescencia en mamíferos es un período de transición entre la infancia y la etapa adulta. Durante el mismo ocurren procesos de maduración cognitiva, emocional y social asociados a la remodelación de circuitos neurales debida a la poda sináptica y muerte neuronal (Brenhouse & Andersen, 2011; Spear, 2000), a los cambios hormonales (Sisk & Foster, 2004) y a la experiencia obtenida en las interacciones sociales (Burlison et al., 2016). Durante la adolescencia, los individuos exhiben un perfil comportamental asociado al estado de maduración de diversos sistemas neurales (Brenhouse & Andersen, 2011; Simon & Moghaddam, 2015). Por este motivo, la adolescencia representa un excelente momento para profundizar en la comprensión de la ontogenia de comportamientos sociales, como lo es el comportamiento sexual, así como de los mecanismos neurales que median su expresión. En particular, centramos nuestra investigación en hembras, ya que el desarrollo de la conducta reproductiva femenina ha sido pobremente estudiada.

Las ratas hembra adolescentes comienzan a exhibir ciclos ováricos y por lo tanto comportamiento sexual en el proestro tardío de su ciclo estral, luego de que ocurre la apertura vaginal entre los días 35-37 posnatales (DPN) (Hashizume & Ohashi, 1984), sin embargo, se desconoce cómo es la expresión de la motivación y el comportamiento sexual durante este período. En este sentido, resultados recientes de nuestro grupo de investigación indican que hembras durante la adolescencia tardía (aprox. 50 DPN) exhiben una mayor exploración social durante la interacción con un macho y probablemente juego (Agrati et al., 2018). Debido a que tanto el juego como la exploración social varían a lo largo de la adolescencia (Vanderschuren et al., 2016), es posible que estos comportamientos se expresen con mayor intensidad durante la adolescencia media (aprox. 40 DPN), y que esta expresión interfiera con la motivación sexual. Sin embargo, desconocemos cómo es la expresión de la motivación y el comportamiento sexual durante la adolescencia media.

El sistema dopaminérgico mesocorticolímbico, considerado un sistema motivacional general (Berridge & Robinson, 1998), ha sido implicado en la regulación de los aspectos motivacionales del comportamiento sexual de la hembra adulta, tanto a través de estudios farmacológicos como empleando marcadores de activación neuronal -principalmente c-Fos- (Afonso, 2009; Graham y Pfaus, 2012; Pfaus & Heeb, 1997). De forma interesante, este sistema se encuentra en desarrollo durante la adolescencia (Brenhouse & Andersen, 2008), período en el cual las hembras comienzan a expresar interés sexual. Simon y Moghaddam (2015) postularon que durante la adolescencia, el circuito neural de recompensa incluiría, además del sistema mesocorticolímbico, una vía complementaria de procesamiento que incluiría a la corteza orbitofrontal, indicando que el

procesamiento neural de estímulos con valor de incentivo difiere entre individuos adultos y adolescentes. No se han descrito aún las áreas neurales asociadas a expresión de la motivación sexual de las ratas durante la adolescencia.

En base a estos antecedentes planteamos las siguientes HIPÓTESIS de trabajo:

- 1- La motivación sexual de las ratas hembras durante la adolescencia es menor respecto a la etapa adulta, y su expresión se acompaña de componentes propios del juego y de la exploración social; siendo esta diferencia mayor en etapas tempranas.
- 2-El circuito neural que modula la expresión de la motivación sexual difiere entre las hembras adolescentes y adultas.

Para poner a prueba estas hipótesis nos planteamos los siguientes OBJETIVOS GENERALES:

- 1- Caracterizar la motivación sexual y el comportamiento de hembras en proestro tardío durante la interacción con un macho a lo largo de la adolescencia.
- 2- Evaluar si el circuito neural asociado a la expresión de la motivación sexual difiere entre hembras adolescentes y adultas.

Con el fin de cumplir el objetivo general 1, planteamos los siguientes OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- 1- Determinar si el valor de incentivo sexual del macho difiere entre hembras en proestro tardío durante la adolescencia media (39-43 DPN) y tardía (49-53 DPN) y la etapa adulta (aprox 100 DPN) utilizando dos modelos motivacionales: emisión de USV luego de una interacción social y preferencia sexual.
- 2- Caracterizar la expresión de conductas sexuales motivadas, exploración social y juego durante la interacción con un macho (estímulo sexual) o con una hembra (estímulo social) de ratas en proestro tardío en adolescencia media y tardía, y compárala con la observada en hembras adultas.

Con el fin de cumplir el objetivo general 2, planteamos los siguientes OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- 3- Comparar el patrón de activación neural de áreas de los sistemas dopaminérgicos mesocorticolímbico y de áreas sexuales específicas, a través de cuantificar la expresión de c-Fos como marcador, de hembras en proestro tardío en adolescencia y adultas luego de una interacción sexual, social o ausencia de interacción.
- 4- Comparar la expresión de receptores dopaminérgicos D1 y D2 en áreas de los sistemas dopaminérgicos mesocorticolímbico y en el área preóptica media (área sexual específica) de hembras adolescentes y adultas durante el proestro tardío.
- 5- Determinar si la interferencia con la neurotransmisión dopaminérgica mesocorticolímbica genera una afectación diferencial de las conductas sexuales motivadas de hembras adolescentes respecto a adultas.

En la próxima sección "Metodología/Diseño del estudio" se detalla la justificación del diseño experimental vinculado al abordaje de cada uno de estos objetivos específicos.

A partir de las hipótesis experimentales y de los objetivos específicos planteados, los RESULTADOS ESPERADOS fueron los siguientes:

- 1- Las hembras adolescentes emitirán un mayor número de vocalizaciones ultrasónicas (USV) de 50 kHz luego de un breve contacto con un macho (estímulo sexual), pero también con una hembra (estímulo social) respecto a las hembras adultas en la prueba de emisión de USV. Por otra parte, si bien todas las hembras sexualmente activas preferirán al macho en la prueba de preferencia sexual, las adolescentes explorarán más a las hembras en comparación con las adultas, y este efecto será mayor durante la adolescencia media.
- 2- Las hembras adolescentes exhibirán mayor exploración social y juego durante la interacción sexual respecto a las hembras adultas; observando una mayor co-expresión de comportamientos sociales en la adolescencia media que en la tardía. La mayor exploración social y juego de las hembras adolescentes se evidenciará a su vez en las interacciones sociales con hembras.
- 3- Las hembras adolescentes exhibirán un patrón de activación neuronal, determinado a partir de la cuantificación del número de células que expresen c-Fos, diferente en el circuito de recompensa en comparación al exhibido por las hembras adultas luego de la interacción sexual, destacándose una mayor actividad de la corteza orbitofrontal.
- 4- La unión específica del antagonista de los receptores D1 SCH 23390-(H3) y del antagonista de los receptores D2 nemonapride-(H3) en el sistema dopaminérgico mesocorticolímbico diferirá entre hembras adolescentes y adultas durante el proestro tardío, indicando una expresión diferencial de ambos receptores de acuerdo a la edad.
- 5- Las hembras adolescentes serán menos sensibles que las adultas al efecto de la administración de un fármaco que

altere la neurotransmisión dopaminérgica mesocorticolímbica sobre la expresión de los componentes proceptivos de su comportamiento sexual.

## **Metodología/diseño del estudio**

### **1. DISEÑO EXPERIMENTAL**

#### **1.1. Experimento 1: Motivación y comportamiento sexual a lo largo de la adolescencia (objetivos específicos 1 y 2)**

Utilizamos la prueba de Emisión de USV luego de un breve contacto social (McGinnis & Vakulenko, 2003) para el estudio de la motivación sexual, seguida de una prueba de interacción sexual/social.

Hembras en proestro durante la adolescencia media (39-43 DPN) y tardía (49-53 DPN) y adultas (100-120 DPN) fueron divididas en dos grupos y sometidas a la prueba de emisión de USV luego de un breve contacto con un macho sexualmente activo (estímulo sexual) o con una hembra no-receptiva (estímulo social). Posteriormente las hembras fueron sometidas a una prueba de interacción sexual o social en una arena. Las hembras fueron probadas con el mismo estímulo en la prueba de USV y la de interacción.

#### **1.2. Experimento 2: Motivación sexual a lo largo de la adolescencia (objetivo específico 1)**

Debido a la importancia de utilizar más de un modelo para evaluar el estado motivacional de los individuos (Ventura-Aquino & Paredes, 2017) y a la reducida escala temporal para trabajar con adolescentes, seleccionamos otro modelo incondicionado ampliamente validado: preferencia sexual macho vs hembra (Agrati et al., 2008; 2018).

Hembras en proestro tardío durante la adolescencia media (39-43 DPN) y tardía (49-53 DPN) y adultas (100-120 DPN) fueron sometidas a una prueba de preferencia sexual entre un macho sexualmente activo y una hembra no-receptiva.

#### **1.3. Experimento 3: Expresión de c-Fos asociada a la motivación sexual de hembras adolescentes y adultas (objetivo específico 3)**

Comparamos la expresión de la proteína c-Fos en áreas del circuito de recompensa (corteza prefrontal medial, corteza orbitofrontal y las regiones shell y core del núcleo accumbens) y áreas límbico-hipotalámicas implicadas en la regulación del comportamiento sexual (área preóptica media, APOm, núcleo ventromedial del hipotálamo, NVM, y amígdala medial anterior, Amy Me) de hembras adolescentes y adultas sometidas a una prueba de emisión de USV luego de una interacción sexual/social. Seleccionamos este modelo porque en el experimento 1 determinamos que las hembras en adolescencia media no aumentan su emisión de USV ante un macho y porque permite a la hembra interactuar evitando la estimulación de la intromisión que induce expresión de c-Fos per se. A su vez, selección a c-Fos como marcador de activación neuronal, ya que éste ha sido utilizado para identificar áreas implicadas en el comportamiento sexual (por revisión ver Pfau & Heeb, 1997).

Hembras en proestro tardío durante la adolescencia media (39-43 DPN) y adultas (100-120 DPN) fueron divididas en tres grupos y sometidas a la prueba de emisión de USV luego de un breve contacto con un macho (estímulo sexual), una hembra no-receptiva (estímulo social) o en ausencia de estímulo social (control). Al finalizar la prueba de 10 min de duración, se retiraron los animales estímulo y las hembras experimentales permanecieron en el modelo 50 minutos. Se procesaron los cerebros para determinar la expresión de la proteína c-Fos por inmunohistoquímica.

#### **1.4. Experimento 4: Expresión de receptores D1 y D2 en adolescentes y adultas (objetivo específico 4)**

Procesamos cerebros de hembras en proestro tardío durante la adolescencia y adultas a las 3-4 hs de iniciada la fase de oscuridad. Se estimó la expresión de los receptores D1 y D2 a través de cuantificar la unión de antagonistas selectivos tritiados por autoradiografía. En función de la expresión de receptores dopaminérgicos en áreas vinculadas a la regulación de la motivación sexual, centramos este análisis en áreas del circuito de recompensa (corteza prefrontal medial y core y shell del núcleo accumbens) y en el APOm.

#### **1.5. Experimento 5: Efecto de la administración de cocaína en el comportamiento sexual de adolescentes y adultas (objetivo específico 5)**

Debido a las diferencias encontradas en la densidad de receptores dopaminérgicos en el sistema mesocorticolímbico y a

la evidencia previa que muestra un efecto diferencial de psicofármacos que afectan este sistema en adolescentes (Badanich et al. 2006, Brenhouse & Andersen 2008), como primera aproximación, determinamos si la administración de cocaína, psicoestimulante que aumenta la disponibilidad de dopamina, afectaba de forma diferencial de acuerdo a la edad las conductas sexuales motivadas de las hembras. Con este fin, administramos solución salina o cocaína (10 y 20 mg/kg, ip) a hembras en proestro tardío en adolescencia tardía y adultas 40 min antes de una prueba de comportamiento sexual en una arena de dos niveles. Luego de la prueba de comportamiento sexual se realizó una prueba locomotora para evaluar los efectos motores del fármaco. Seleccionamos este modelo porque permite la expresión por parte de las hembras de solicitudes sexuales, componente altamente motivado del comportamiento sexual (Pfaus et al., 1999). La selección del fármaco, dosis y latencias se basó en el trabajo de Pfaus y colaboradores (2010).

En una segunda etapa, pretendemos determinar si antagonizar los receptores D2 en el shell del núcleo accumbens, afecta diferencialmente el despliegue de conductas sexuales motivadas de las hembras. Con este fin, en el marco del proyecto, realizamos la puesta a punto de las coordenadas y el volumen a inyectar en la región Shell del Nacc de hembras en adolescencia tardía y adultas.

## 1.6. Análisis estadístico

Debido a que la mayoría de los datos comportamentales no se distribuyen normalmente, se analizaron mediante pruebas no-paramétricas: análisis de varianza de Kruskal-Wallis y prueba de U-Mann-Whitney (grupos independientes) y análisis de Friedman y prueba pareada de Wilcoxon (grupos dependientes) (Siegel & Castellan, 1988). De igual forma, los datos de la expresión de la proteína c-Fos no cumplieron con los supuestos para la realización de pruebas paramétricas y fueron analizados con pruebas no paramétricas. En el caso de la densidad de receptores D1 y D2, los datos se analizaron mediante la prueba t de Student para grupos independientes (Sokal & Rohlf, 1969).

## 2. METODOLOGÍA

### 2.1. Animales

Se utilizaron ratas (*Rattus norvegicus*, cepa Wistar) alojadas en el Laboratorio de Experimentación Animal de Facultad de Ciencias. A partir del día 33 de edad se verificó la apertura vaginal. Luego de la apertura vaginal, en el caso de las ratas adolescentes, y del día 90 de edad, en el caso de las adultas, se realizaron diariamente lavados vaginales para seguir los ciclos estales (Montes & Luque, 1988). Los protocolos experimentales fueron aprobados por el CEUA de la Facultad de Ciencias (números de expediente: 240011-002308-14 y 240011-000941-17).

### 2.2. Pruebas comportamentales

Se realizaron entre 3-4 hs luego del comienzo del ciclo oscuro para asegurar la máxima actividad sexual de las hembras. Se utilizaron machos sexualmente activos, de 3 meses de edad en interacciones con adolescentes y de 4,5-5 meses en interacciones con adultas, para evitar efectos debido a la diferencia de tamaño.

Preferencia sexual: macho vs hembra (Agrati et al., 2018)

Se empleó para determinar el valor de incentivo del macho. El modelo consiste en un laberinto en forma de Y con tres cámaras: dos de éstas contienen los estímulos (hembra o macho sexualmente activos), y la tercera permanece vacía. Cada cámara contiene una división transparente perforada, que permite percibir los estímulos, sin contacto físico. La hembra se habitúa al modelo durante 15 min, e inmediatamente después los estímulos son introducidos, registrándose durante 20 min el tiempo de permanencia en cada cámara y la exploración de los estímulos.

Emisión de USV de 50 kHz asociadas a estímulos sociales (McGinnis & Vakulenko, 2003)

Se utilizó para evaluar la motivación sexual de las hembras a través de cuantificar la emisión de USV de 50 kHz en respuesta a un breve contacto con un estímulo social. Se expone a la hembra a un macho sexualmente activo o hembra no-receptiva detrás de una malla que permita ver, oír, olfatear y contacto físico moderado durante 5 min. Luego de esta interacción se retira al estímulo y se registra durante 5 min el número de USV emitidas.

Comportamiento sexual en una arena (Agrati et al., 2018)

Se introduce a la hembra en una arena sexual de acrílico cilíndrica y luego de 5 minutos de habituación, se introduce un macho sexualmente activo y se registra durante 10 min el número de hops&darts y lordosis y latencias a la primera conducta proceptiva y lordosis. También se registra el comportamiento del macho. El cociente de lordosis (número de lordosis/número de montas) se utiliza como índice de receptividad sexual. Basándonos en que las adolescentes expresan mayor exploración social y juego, incorporamos el registro de estos (Klein et al., 2010).

Comportamiento sexual en arena de dos niveles (Mondino et al., 2019)

Se introduce a la hembra en una arena sexual de acrílico de dos niveles (60 cm de largo x 51 cm de alto x 15 cm de ancho). Luego de un período de habituación de 5 min, se introduce un macho y se registra durante 10 min las solicitudes sexuales que realizan las hembras, además de los mismos comportamientos mencionados en la prueba anterior.

2.3. Cuantificación de las proteínas de expresión temprana c-Fos por inmunohistoquímica (Pose et al., 2019)

Se realizó una técnica inmunohistoquímica para la detección de c-Fos en cortes de 30  $\mu$ m de espesor conteniendo las áreas de interés, free floating. Utilizamos anticuerpo primario anti-Fos rabbit (1:2.000; sc-52, Santa Cruz Biotechnology) y anticuerpo secundario anti-rabbit (1:500, Vector Laboratories). Se amplificó con el complejo avidina-biotina (ABC) y se reveló con 3, 3' diaminobenzidina (kit de Laboratorios Vector). El conteo de células positivas en las regiones de interés se realizó utilizando el software NIH-Image-J en microfotografías (10x).

2.4. Cuantificación de receptores D1 y D2 por autoradiografía (Moran-Gates et al., 2007)

Se realizó una autoradiografía sobre cortes de 12  $\mu$ m de espesor conteniendo las áreas de interés montados en portaobjetos. Se utilizó 1 nM de [3H]SCH23390, antagonista D1, y de [3H]nemonapride, antagonista D2. La unión no-específica se determinó con 10  $\mu$ M de SCH23390 y con 10  $\mu$ M de sulpiride. Los cortes secos se expusieron con estándares de tritio calibrados 4 a 12 semanas con films de autoradiografía sensibles a tritio. Las placas reveladas se analizaron utilizando el software Image J de NIH.

## Resultados, análisis y discusión

A continuación se describen los principales resultados y su interpretación por experimento:

### 1. Experimentos 1 y 2: Motivación sexual a lo largo de la adolescencia

Utilizando el modelo de emisión de USV luego de una interacción social, determinamos que las hembras en adolescencia tardía, al igual que las adultas, emiten un mayor número de USV en respuesta a un macho que a una hembra. Sin embargo, las hembras en adolescencia media no vocalizan de forma diferente frente a un macho y a una hembra. Este resultado se refuerza con el obtenido en el modelo de preferencia sexual, en el cual observamos que las hembras en adolescencia media permanecen menos tiempo en el comportamiento del macho que las adultas y realizan menos esfuerzo por acceder a éste en comparación a las adolescentes tardías y adultas.

En conjunto, los resultados de ambos experimentos indican que las hembras sexualmente activas en adolescencia media poseen una menor motivación sexual que las hembras durante la adolescencia tardía y la adultez.

Estos resultados se presentaron en eventos científicos, forman parte de la tesina de grado de Magdalena Armas y del artículo: Increase in sexual motivation throughout adolescence in the cycling female rat. Armas et al., 2021. (<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/dev.22162>).

### 2. Experimento 1: Comportamientos sexual y social durante a lo largo de la adolescencia

A pesar de expresar menor motivación sexual, durante la interacción sexual con un macho, las hembras en adolescencia media exhibieron una receptividad sexual máxima, evidenciada por un cociente de lordosis de 1, y la expresión de conductas proceptivas no difirió de la presentada por adolescentes tardías y adultas. Sin embargo, las hembras en adolescencia media presentaron mayor exploración social, evaluada por los olfateos corporales y anogenitales del macho, y juego en relación a las hembras adultas.

La mayor exploración social y juego de las hembras en adolescencia media, parece responder a un perfil conductual

expresado en interacciones sociales típico de este período, ya que durante la interacción social con una hembra, las adolescentes –tanto en adolescencia media como tardía– exhibieron mayor exploración olfativa en relación a las adultas y niveles elevados de juego. Sin embargo, durante la interacción sexual, la expresión de mayor exploración social y juego de las adolescentes no interfirió con la expresión de conductas sexuales motivadas, sugiriendo que la motivación sexual predomina sobre la social durante la interacción con un macho.

Los resultados de este experimento muestran que las hembras en adolescencia media son capaces de expresar el perfil comportamental de las adultas durante una interacción sexual, si bien co-expresan comportamientos típicos del período de desarrollo en el cual se encuentran.

Estos resultados se presentaron en eventos científicos, forman parte de la tesis de maestría de Gabriella Marín "Desarrollo del comportamiento sexual de la rata hembra durante la adolescencia y sus bases neurales" y del artículo previamente mencionado.

### 3. Experimento 3: Expresión de c-Fos asociada a la motivación sexual de hembras adolescentes y adultas

La interacción con un macho a través de la rejilla indujo una expresión diferente de la proteína c-Fos, como índice de activación neuronal, en hembras sexualmente activas en adolescencia media y adultas. Dos regiones límbico-hipotalámicas implicadas en la asignación del valor sexual a un macho (Pfaus et al., 2015), la porción ventrolateral del VMN (VMN vl) y la amígdala medial anterior (Amy Me), presentaron mayor expresión de c-Fos luego de la interacción con un macho en relación a ausencia de estímulo, tanto en adolescentes como en adultas. De forma interesante, esta expresión fue más específica en hembras adultas, ya que difirió tanto de la situación control como de la exposición a una hembra (estímulo social). Esta activación en respuesta al macho puede reflejar el valor de incentivo sexual que éste posee para hembras en proestro tardío, y que es mayor para adultas que para adolescentes (Experimentos 1 y 2).

Por otra parte, la exposición a un macho incrementó la expresión de c-Fos de varias regiones del sistema dopaminérgico mesocorticolímbico, circuito general de recompensa (Berridge & Robinson, 1998), incluyendo la región Shell del Núcleo Accumbens, la corteza prefrontal medial prelímbica y la corteza orbitofrontal únicamente en hembras adolescentes, indicando que el macho es procesado en este circuito de forma diferente entre ratas adolescentes y adultas. En particular, la expresión de c-Fos en la corteza prefrontal medial y la orbitofrontal fue marcadamente mayor en adolescentes respecto a las adultas. Debido a que estas áreas presentan un grado de inmadurez importante durante la adolescencia e inervan áreas más bajas del sistema mesocorticolímbico, la actividad de ambas cortezas puede haber influido en la actividad de otras estructuras durante la adolescencia.

Estos resultados se presentaron en eventos científicos y forman parte de la tesis de maestría de Gabriella Marín "Desarrollo del comportamiento sexual de la rata hembra durante la adolescencia y sus bases neurales".

### 4. Experimento 4: Receptores dopaminérgicos de hembras adolescentes y adultas sexualmente activas

Al comparar la expresión de receptores dopaminérgicos entre la adolescencia tardía y la adultez en hembras sexualmente activas, determinamos que las hembras en proestro tardío poseen una menor unión de [H3]-nemonapride (índice de la densidad de receptores dopaminérgicos D2) en la región del Shell del Núcleo Accumbens durante la adolescencia tardía en comparación a la etapa adulta y una mayor unión de este antagonista tritizado y de [H3]-SCH 3390 (índice densidad de receptores D1) en la corteza prefrontal medial en comparación con las adultas. Por otra parte, no detectamos diferencias entre ambas edades en la unión de estos ligados en el APOm.

Estos resultados evidencian variaciones en la expresión de receptores dopaminérgicos en el sistema mesocorticolímbico entre hembras adolescentes y adultas. Estas variaciones podrían reflejar un funcionamiento diferente de este sistema general de recompensa de acuerdo a la edad.

Estos resultados se presentaron en eventos científicos y forman parte de un manuscrito en fase de escritura.

### 5. Experimento 5: Efecto de la cocaína en el comportamiento sexual de hembras adolescentes y adultas

La administración sistémica de cocaína redujo la expresión de conductas proceptivas (índice de la motivación sexual de las hembras) de forma dosis dependiente en las hembras adultas pero no en las ratas en adolescencia tardía. A su vez, la administración de la dosis mayor de cocaína (20 mg/kg) disminuyó el cociente de lordosis de hembras adultas pero no de

las adolescentes. Ambos resultados muestran: 1. un efecto negativo de la cocaína sobre el comportamiento sexual de hembras adultas y 2. una menor sensibilidad de las hembras adolescentes a este efecto. Esta menor sensibilidad puede estar relacionada a las diferencias encontradas en la expresión de receptores dopaminérgicos en el sistema (Experimento 4).

Estos resultados se presentaron en eventos científicos, forman parte de la tesina de grado de Lucía Rehermann y de un manuscrito en fase de escritura.

Asimismo, se logró la puesta a punto de las coordenadas de inyección en la región Shell del NAcc en hembras adolescentes (aprox. 50 PND) y adultas (aprox. 95 PND).

### **Conclusiones y recomendaciones**

A partir de la ejecución del presente proyecto se logró avanzar de forma significativa en la comprensión del desarrollo de la motivación y el comportamiento sexual en la rata hembra adolescente naturalmente ciclante, así como comenzar a analizar los cambios neurales que median este desarrollo.

Las principales conclusiones se enumeran a continuación:

- Si bien las ratas hembra en adolescencia media son capaces de expresar el repertorio completo del comportamiento sexual durante la cópula con un macho, su motivación sexual es baja, aumentando a lo largo de la adolescencia.
- Las hembras en adolescencia media expresan un perfil conductual único durante la cópula, que incluye altos niveles de investigación social y juego, comportamientos típicos de este período del desarrollo.
- Existe un procesamiento diferente del estímulo macho en el sistema dopaminérgico mesocorticolímbico de hembras sexualmente activas en adolescencia media en relación a las adultas.
- A pesar de que la motivación sexual no difiere entre hembras en adolescencia tardía y adultas, su sistema dopaminérgico mesocorticolímbico y la respuesta del mismo a un psicoestimulante sí difiere, sugiriendo variaciones en el procesamiento y control del comportamiento sexual en la adolescencia tardía en relación a la adultez.

Los resultados obtenidos permitieron, hasta el momento, generar dos manuscritos científicos, uno ya publicado y el otro en fase de redacción, y fueron presentados en eventos científicos nacionales e internacionales. Por este motivo, entendemos que los resultados están contribuyendo, y contribuirán, al cuerpo de conocimiento de esta área de estudio. En particular, el conocimiento vinculado a la regulación de comportamientos sociales en hembras permite entender mejor el desarrollo de individuos femeninos, que difiere del masculino y ha sido tradicionalmente menos estudiado.

Asimismo, a partir del desarrollo y culminación de este proyecto surgieron perspectivas de continuación vinculadas a la regulación endócrina de los circuitos neurales que median la maduración de la motivación sexual, que serán abordados en un proyecto CSIC I+D.

Finalmente, destacamos que en el marco del presente proyecto se desarrollaron dos tesinas de grado y una tesis de maestría, contribuyendo de esta forma a la formación de recursos humanos, y a la vez que se fortalecieron vínculos de investigación existentes entre laboratorios nacionales e internacionales.

## Referencias bibliográficas

- Afonso, V.M., Mueller, D., Stewart, J., Pfaus, J.G., 2009. Amphetamine pretreatment facilitates appetitive sexual behaviors in the female rat. *Psychopharmacology* 205(1), 35-43.
- Agrati, D., Fernández-Guasti, A., Ferreira, A., 2008. The reproductive stage and experience of sexually receptive mothers alter their preference for pups or males. *Behavioral neuroscience* 122(5), 998.
- Agrati, D., Machado, L., Delgado, H., Uriarte, N., Zuluaga, M. J., & Ferreira, A. (2019). Sexual behaviour of the female rat during late adolescence: effect of chronic cocaine treatment. *Behavioural pharmacology*, 30(5), 396-404.
- Badanich, K.A., Adler, K.J., Kirstein, C.L., 2006. Adolescents differ from adults in cocaine conditioned place preference and cocaine-induced dopamine in the nucleus accumbens septi. *European journal of pharmacology* 550(1), 95-106.
- Beach, F.A., 1976. Sexual attractivity, proceptivity, and receptivity in female mammals. *Hormones and behavior* 7(1), 105-138.
- Berridge, K.C., Robinson, T.E., 1998. What is the role of dopamine in reward: hedonic impact, reward learning, or incentive salience? *Brain Research Reviews* 28(3), 309-369.
- Brenhouse, H.C., Andersen, S.L., 2008. Delayed extinction and stronger reinstatement of cocaine conditioned place preference in adolescent rats, compared to adults. *Behavioral neuroscience* 122(2), 460.
- Brenhouse, H.C., Andersen, S.L., 2011. Developmental trajectories during adolescence in males and females: A cross-species understanding of underlying brain changes. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 35(8), 1687-1703.
- Burleson C.A., Pedersen R.W., Seddighi S., DeBusk L.E., Burghardt G.M., Cooper M.A., 2016. Social play in juvenile hamsters alters dendritic morphology in the medial prefrontal cortex and attenuates effects of social stress in adulthood. *Behav Neurosci.* 130(4):437-47.
- Graham, M.D., Pfaus, J.G., 2012. Differential effects of dopamine antagonists infused to the medial preoptic area on the sexual behavior of female rats primed with estrogen and progesterone. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 102(4), 532-539.
- Hashizume, K., ?hashi, K., 1984. Timing of sexual receptivity and the release of gonadotrophins during puberty in female rats. *Journal of reproduction and fertility* 72(1), 87-91.
- Klein, Z.A., Padow, V.A., Romeo, R.D., 2010. The effects of stress on play and home cage behaviors in adolescent male rats. *Developmental psychobiology* 52(1), 62-70.
- Manduca A., Servadio M., Damsteegt R., Campolongo P., Vanderschuren L.J., Trezza V., 2016. Dopaminergic Neurotransmission in the Nucleus Accumbens Modulates Social Play Behavior in Rats. *Neuropsychopharmacology.* 41(9):2215-23.
- McGinnis MY, Vakulenko M., 2003. Characterization of 50-kHz ultrasonic vocalizations in male and female rats. *Physiol Behav.* 80(1):81-8.
- Mondino, A., Fernández, S., Garcia-Carnelli, C., Castro, M. J., Umpierrez, E., Torterolo, P., ... & Agrati, D. (2019). Vaporized Cannabis differentially modulates sexual behavior of female rats according to the dose. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 187, 172814.
- Montes, G., Luque, E., 1988. Effects of ovarian steroids on vaginal smears in the rat. *Cells Tissues Organs* 133(3), 192-199.
- Moran-Gates, T., Grady, C., Park, Y.S., Baldessarini, R.J., Tarazi, F.I., 2007. Effects of risperidone on dopamine receptor subtypes in developing rat brain. *European neuropsychopharmacology* 17(6), 448-455.
- Nowend, K. L., Arizzi, M., Carlson, B. B., & Salamone, J. D. (2001). D1 or D2 antagonism in nucleus accumbens core or dorsomedial shell suppresses lever pressing for food but leads to compensatory increases in chow consumption. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 69(3-4), 373-382.
- Paxinos, G., Watson, C., 1998. A stereotaxic atlas of the rat brain. New York: Academic.
- Pose, S., Zuluaga, M. J., Ferreño, M., Agrati, D., Bedó, G., & Uriarte, N. (2019). Raising overlapping litters: Differential activation of rat maternal neural circuitry after interacting with newborn or juvenile pups. *Journal of neuroendocrinology*, 31(9), e12701.
- Pfaus, J.G., Heeb, M.M., 1997. Implications of immediate-early gene induction in the brain following sexual stimulation of female and male rodents. *Brain research bulletin* 44(4), 397-407.
- Pfaus, J.G., Smith, W.J., Coopersmith, C.B., 1999. Appetitive and consummatory sexual behaviors of female rats in bilevel chambers: I. A correlational and factor analysis and the effects of ovarian hormones. *Hormones and behavior* 35(3), 224-240.

- Pfaus, J.G., Wilkins, M.F., DiPietro, N., Benibgui, M., Toledano, R., Rowe, A., Couch, M.C., 2010. Inhibitory and disinhibitory effects of psychomotor stimulants and depressants on the sexual behavior of male and female rats. *Hormones and Behavior* 58(1), 163-176.
- Siegel, S., Castellan Jr., N.J., 1988. *Nonparametric Statistics for The Behavioral Sciences*, Second ed. McGraw-Hill, New York.
- Simon, N.W., Moghaddam, B., 2015. Neural processing of reward in adolescent rodents. *Developmental cognitive neuroscience* 11, 145-154.
- Sisk, C.L., Foster, D.L., 2004. The neural basis of puberty and adolescence. *Nature neuroscience* 7(10), 1040-1047.
- Sokal, R.R., Rohlf, F.J. (1969) *Biometría. Principios y métodos estadísticos en la investigación biológica*. Blume Madrid, España.
- Spear, L.P., 2000. The adolescent brain and age-related behavioral manifestations. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 24(4), 417-463.
- Steinberg, L., 2005. Cognitive and affective development in adolescence. *Trends in Cognitive Sciences* 9(2), 69-74.
- Vanderschuren L.J., Achterberg E.J., Trezza V., 2016. The neurobiology of social play and its rewarding value in rats. *Neurosci Biobehav Rev.* 70:86-105.
- Ventura-Aquino E, Paredes RG. 2017 *Animal Models in Sexual Medicine: The Need and Importance of Studying Sexual Motivation*. *Sex Med Rev.* 5(1):5-19.

## **Licenciamiento**

Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional. (CC BY-NC-ND)